

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463030

研究課題名(和文) 口腔内灼熱症候群における口腔細菌・真菌産生アセトアルデヒドの影響と治療法の確立

研究課題名(英文) Influence of oral bacteria / fungus-producing acetaldehyde on oral burning mouse syndrome and establishment of therapy

研究代表者

豊田 長隆 (TOYODA, NAGATAKA)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：80257344

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Burning mouse syndrome (口腔内灼熱症候群)の病因解明を目的に、口腔内細菌・真菌によるアセトアルデヒド産生、ならびにアセトアルデヒドによる口腔粘膜への為害作用について検討した。口腔内真菌であるCandida属においてアセトアルデヒドの産生、ならびにアセトアルデヒドによる口腔粘膜上皮細胞の上皮分化マーカーの抑制を認めたことから、アセトアルデヒドによる口腔粘膜への為害作用が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the pathogenesis of Burning mouse syndrome, we examined acetaldehyde production by oral bacteria / fungi and adverse effects on oral mucosa by acetaldehyde. It was suggested that acetaldehyde was produced in the genus Candida which is an oral fungus and inhibition of epithelial differentiation marker of oral mucosal epithelial cells by acetaldehyde, so that acetaldehyde had an adverse effect on the oral mucosa.

研究分野：口腔外科(口腔内科学)

キーワード：口腔内灼熱症候群 口腔細菌・真菌産生 アセトアルデヒド

## 1. 研究開始当初の背景

近年わが国においても口腔内科学会が設立され、原因が明らかで外科的な加療を必要とする口腔外科的疾患の影となり、これまではその原因や治療について科学的に十分な検証がなされてこなかった。口腔内科学的疾患の原因の解明とその治療に多方面から期待が寄せられている。なかでも Burning mouth syndrome (口腔内灼熱症候群、以下 BMS) は、口腔粘膜に何らの器質的異常所見が認められないにも関わらず、舌、口唇、口蓋や他の口腔粘膜に灼熱感や疼痛を生じる病態であり、治療に苦慮することが多い。BMS は国際疼痛学会の慢性疼痛分類では、正常な兆候と検査所見にもかかわらず最低 4~6 か月続く、舌やその他の口腔粘膜の灼熱痛と定義されている。BMS は原因の特定できない一次性と、症状を引き起こす原因疾患 (局所的要因として口腔乾燥や口腔感染症、扁平苔癬や地図状舌などの口腔粘膜疾患、口腔パラファンクション、ガルバニー電流、アレルギーなど、全身的要因として造血障害、栄養欠乏、胃食道逆流症、内分泌系障害、薬剤の副作用、パーキンソン病や三叉神経痛などの中枢神経系障害など) の明らかな二次性があり、一次性 BMS の病因は局所的、全身的、心理的に多数の因子が関与していると考えられ、末梢神経障害、中枢神経障害、心理的要因などがその病因候補として報告されているが、いまだ確定せず論争が続いている。病因が明らかでないため、現在のところ明確な治療法はなく、緩和療法が主体となっている。簡易精神療法や自律訓練法、認知行動療法などによる心理的アプローチや、三環系、四環系、SSRI などの抗うつ薬による薬物療法等が行われているが、奏効しない症例も多々認められ、継続する症状から日常生活に支障を来す患者も多く、また、医療従事者も困難な治療に難渋することが多い。

近年、生活習慣と口腔環境に関する調査から、唾液中のアセトアルデヒドが口腔粘膜に為害作用を及ぼす可能性が指摘されつつある。この唾液中アセトアルデヒドは、飲酒後に肝臓でエタノールがアルコール脱水素酵素により代謝され産生されると報告されているが、最近、口腔内常在細菌・真菌がアセトアルデヒドを産生している可能性が指摘されている (Acta Odontol Scand, 66:321-326, 2008)。また、唾液中のアセトアルデヒド濃度と *Candida albicans* 保有率との間に有意な相関があり、アセトアルデヒド高濃度群の被験者から分離された *Candida albicans* のアセトアルデヒド産生能が高いことも報告されており (Alcohol Clin Exp Res, 23:1409-1415, 1999)、さらには口腔細菌叢の中ではグラム陽性菌と *Candida albicans* がアセトアルデヒド産生能を有することが報告されている

(Carcinogenesis, 21:663-668, 2000)。このように、口腔内細菌・真菌がアセトアルデヒドを産生し、口腔粘膜に為害作用を及ぼすのであれば、BMS における口腔粘膜の異常疼痛の一因となっている可能性が考えられ、このアセトアルデヒド産生細菌を直接制御、あるいは産生されたアセトアルデヒドによる口腔粘膜への為害作用を抑制することで、BMS の新たな治療につながる可能性が考えられる。組織や細胞では、生命活動のためにミトコンドリア内で ATP が産生される際に生じる ROS (活性酸素やフリーラジカルなど) の作用による、ミトコンドリア膜タンパクや脂質の酸化、ミトコンドリア DNA の損傷により、ミトコンドリアの機能異常を引き起こし、細胞老化や細胞障害につながるものと考えられている。口腔粘膜疾患においてもこのような酸化ストレスが口腔粘膜疾患の発症の一因となっている可能性が考えられ、アセトアルデヒドが口腔粘膜に作用する場合にも、直接あるいは間接的な酸化ストレスが、為害作用の要因となっている可能性が考えられる。生体内ではこの酸化ストレスに対してカタラーゼなどの様々なフリーラジカルスカベンジャーが働くことで酸化ストレスを抑制していることが報告されている。そこで、BMS の要因となり得る口腔内細菌・真菌が産生するアセトアルデヒドに対して何らかのフリーラジカルスカベンジャーを治療に用いることができる可能性に着目した。

メラトニンは、概日リズム調節ホルモンとして知られ、これまでに体温調節、免疫賦活、抗腫瘍、抗酸化作用などが報告されており、唾液中にも存在することが知られている (J Clin Endocrinol Metab, 83:1013-1015, 1998)。これまでにわれわれはメラトニンが唾液腺において産生・分泌されていることを報告し (Histochem Cell Biol, 135:389-396, 2011)、口腔内で何らかの生理的役割を担っている可能性について研究してきた。その結果、予備的実験結果ながら、放射線性口内炎に対してメラトニンが予防効果を持つ可能性を見出している。そこで、BMS の要因となり得るアセトアルデヒドに対しても強力なフリーラジカルスカベンジャーであるメラトニンがその予防あるいは治療効果を発揮する可能性に着目した。以上のことから本研究では、唾液中アセトアルデヒドに対するメラトニンの効果について明らかにすることを目的とする。アセトアルデヒドは口腔内において発がん作用を有することも知られており、本研究を遂行することで期待した結果が得られれば、BMS 等の口腔内科学的疾患に対する予防・治療法となるのみでなく、その病因解明の一助ともなり、また口腔癌に対する予防効果をも期待でき、超高齢社会を迎えたわが国国民の QOL の維持・向上に大きく貢献しうると考えられる。

## 2. 研究の目的

近年増加する Burning mouse syndrome (口腔内灼熱症候群、BMS)は、口腔粘膜に何らの器質的異常が認められないにもかかわらず、口腔粘膜に灼熱感や疼痛を自覚する病態であり、いまだ病因が不明で、治療法も確立していない。このことから本研究では、BMS などの病因・病態不明の口腔内科的疾患に、口腔内細菌・真菌の産生するアセトアルデヒドが関与している可能性に着目し、アセトアルデヒドによる口腔粘膜への為害作用がBMSなどの病因不明の疾患に関与している可能性が高いと考えた。そこで本研究は、各種口腔内細菌・真菌によりアセトアルデヒドが産生されていること、アセトアルデヒドが口腔粘膜に為害作用を有することを証明するとともに、アセトアルデヒドによる口腔粘膜への為害作用を酸化ストレスを指標に解析し、その為害作用を強力なフリーラジカルスカベンジャーであるメラトニンにより予防あるいは治療することが可能かどうか検討することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1)口腔内細菌・真菌におけるアセトアルデヒド産生量の測定

各種口腔内細菌・真菌が通常培養時にどの程度のアセトアルデヒドを産生しているのかを明らかにするとともに、アルコール脱水素酵素、アルデヒド脱水素酵素の活性についても併せて測定する。口腔内細菌としては、舌表面に多く認められる *S. salivarius*、*S. sanguinis*、*S. mitis*、*Veillonella* 属、*Neisseria* 属等、プラーク中に多く認められる *S. sanguinis*、*S. mitis*、*S. mutans*、*S. sobrinus*、*Actinomyces* 属、*Corynebacterium* 属、*Propionibacterium* 属等、歯肉溝に多く認められる *Porphyromonas* 属、*Prevotella* 属等を対象として、また、代表的な口腔内真菌として *Candida* 属のうち、*Candida albicans*、*Candida glabrata*、*Candida parapsilosis*、*Candida tropicalis* を対象とした。まずアセトアルデヒド産生量は、対象となる菌について、菌体自体および抽出物をエタノール存在下に 37 で incubate し、head space gas chromatography にて測定した。また、アルコール脱水素酵素活性はエタノールを基質、NAD を補酵素として 340nm における NADH 生成量より測定し、さらにアルデヒド脱水素酵素活性を比色法あるいは蛍光法により測定した。これらの結果により、いずれの口腔内細菌・真菌が高いアセトアルデヒド産生能を持つのか、また、アルコール脱水素酵素活性が高いのか、あるいはアルデヒド脱水素酵素の活性が低いのかを明らかにし、口腔粘膜に為害作用を与えうる菌種につい

て検討した。

### (2)メラトニン添加によるアセトアルデヒド産生量の変化

(1)と同様にそれぞれの口腔内細菌・真菌を培養し、その培養時に各種濃度のメラトニンを添加することで、産生または遊離されるアセトアルデヒド量に変化があるかどうかについて検討した。

### (3)口腔粘膜組織に対するアセトアルデヒドの影響

培養口腔粘膜組織に対するアセトアルデヒドの為害作用について明らかにするため、ラビットから口腔粘膜を摘出し、これを気相液層界面培養する。このとき、アセトアルデヒドを添加して一定期間培養後固定し、アセトアルデヒドの影響について検討した。まず、固定組織に対して上皮の分化マーカーである involucrin、transglutaminase、keratin1、4、10、13 および 14、filaggrin、defensin、caspase3 および 14 などの発現を免疫組織化学的手法により検討することで、アセトアルデヒドの影響が培養口腔粘膜組織にどのような影響を与えたかを検討した。さらに TUNEL 染色により細胞のアポトーシスを、抗 8-OHdG 抗体を用いて DNA 損傷を、抗 neuroketal 抗体や抗 4-hydroxynonetal 抗体を用いて脂質の酸化ダメージを、抗 SOD1 抗体や抗 nNOS 抗体、抗 HIF1a 抗体を用いてタンパク質の酸化ダメージを免疫組織化学的に検討することで、アセトアルデヒドの培養口腔粘膜組織に対する為害作用について検討した。

## 4. 研究成果

### (1)口腔内細菌・真菌におけるアセトアルデヒド産生量の測定

口腔内細菌・真菌におけるアセトアルデヒド産生量の測定したところ、*Candida* 属においてアセトアルデヒドの産生を認めた。

### (2)メラトニン添加によるアセトアルデヒド産生量の変化

アセトアルデヒド産生を認めた *Candida* 属において、メラトニン添加によりアセトアルデヒド産生量の低下を認めた。

### (3)口腔粘膜上皮細胞に対するアセトアルデヒドの影響

上皮分化マーカーである involucrin、transglutaminase、keratin14、10、13 および 14 の抑制を認めた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

福島 龍洋、館原 誠晃、竹部 祐生亮、戸田(徳山)麗子、里村 一人、田所 晋  
3 次元培養によるヒト歯髄幹細胞シート

の骨形成能の促進

第 26 回日本口腔内科学会・第 29 回口腔  
診断学会合同学術大会 2016 年 6 月 23  
日～24 日.さん太ギャラリー(岡山県岡  
山市).

竹部 祐生亮、館原 誠晃、今村 武浩、福  
島 龍洋、戸田(徳山) 麗子、里村 一人  
歯髄幹細胞の効率的回収を可能とする新  
規凍結保存法の開発

第 26 回日本口腔内科学会・第 29 回口腔  
診断学会合同学術大会 2016 年 6 月 23  
日～24 日.さん太ギャラリー(岡山県岡  
山市).

6 . 研究組織

(1)研究代表者

豊田 長隆 (TOYODA NAGATAKA)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：80257344

(2)研究分担者

井出 信次 (IDE SHINJI)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：00611998

徳山 麗子 (TOKUYAMA REIKO)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：20380090

里村 一人 (SATOMURA KAZUHITO)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：80243715

館原 誠晃 (TATEHARA SEIKO)

鶴見大学・歯学部・講師

研究者番号：90380089